

Imunologie a imunopatologie reprodukčního procesu

II. Imunologie těhotenství, opakovaného potrácení a poruch implantace blastocysty

Immunology and immunopathology of reproduction II. Immunology of pregnancy, recurrent abortion and failure of blastocyst implantation

KAREL NOUZA¹, JINDŘICH MADAR², MARTIN NOUZA¹, EDUARD KUČERA²

¹Centrum klinické imunologie, Praha 1

²Ústav pro péči o matku a dítě, Praha 4 – Podolí

SOUHRN

Těhotenství představuje nejvýznamnější výjimku z imunologických zákonů, kde jsou matkou nejen snášeny, ale i všestranně podporovány semi-alogenní blastocysty, embrya a fety. Pozoruhodná tolerance je zajišťována složitými imunoregulačními mechanismy na straně matky, trofoblastu i plodu. Jejich selhání pak patří k nejčastějším příčinám ztráty plodu. Klíčovým krokem k úspěšnému otěhotnění je implantace – nidace – oplodněného vajíčka. Její mechanismy jsou v poslední době intenzivně studovány s cílem určit konkrétní implantační poruchy, zodpovědné nejen za opakované ztráty plodu, ale i značnou část sterilít a neúspěšných embryotransferů. Postupně se rozšiřují a zdokonalují diagnostické metody těhotenských poruch a zvyšuje úspěšnost jejich prevence a léčby.

Klíčová slova: imunologie těhotenství, příčiny opakovaného potrácení, autoimunitní a aloimunitní potrácení, léčba „imunologického“ potrácení, prekoncepční péče, imunologie implantace a jejich poruch

SUMMARY

Pregnancy represents the most important exception from immunological laws, where the mother's organism not only tolerate, but even provides many-sided support to semiallogeneic blastocyst, embryo and fetus. The remarkable tolerance is guaranteed by complex immunoregulatory mechanisms on the part of mother, trophoblast and fetus. Their failures belong to the most frequent causes of fetal losses. The key step to successful pregnancy is the implantation – nidation - of the fertilized egg. Its mechanisms are lately intensively studied with the goal to determine the nature of concrete implantation failures, responsible not only for recurrent abortions, but also for significant portion of sterilities and unsuccessful embryotransfers. Gradually we register new diagnostic methods of pregnancy failures and an increase of efficacious prevention and treatment.

Key words: Immunology of pregnancy, Causes of recurrent abortion, Autoimmune a alloimmune abortion, Treatment of immunologically mediated abortion, Preconception care, Immunology of implantation and of its failures

1. Imunologie těhotenství

Reprodukce jednoduchých organismů – mikrobu a jednobuněčných živočichů a rostlin – se uskutečňuje prostým dělením, na úrovni hub přistupuje i sexuální množení. Až do úrovně ryb probíhá splynutí samčích a samičích pohlavních buněk a vznik nového jedince mimo samičí organismus. U obojživelníků, plazů, ptáků a primitivních savců jsou noví jedinci izolováni v sami-

čím těle obalem vejce a teprve u savců probíhá kontakt a splynutí pohlavních buněk i celý vývoj nových jedinců bez anatomické izolace v samičím těle.

Při běžném pohledu na reprodukci v biologické říši i u člověka přijímáme bez podivu dvě pozoruhodnosti: ta první, existující od začátku pohlavního rozmnožování, spočívá v bezproblémovém kontaktu, splynutí a dalším vývoji geneticky rozdílných (byť haplotypových) samčích a samičích buněk, ta druhá spočívá v hladkém vývoji

semialogenního jedince v matčině těle. První zákonitost přenecháme biologickým filozofům, druhá klíčově souvisí s pojednávaným problémem.

Specifické antigenní struktury tkání funkčních rozplazovacích orgánů se objevují v těle až kolem puberty, dlouho po dosažení imunologické zralosti jedince. Netěší se proto perinatálně navozené imunologické toleranci. Přesto imunitní systém ženy toleruje za normálních okolností „semialogenní“ oplozené vejce, trofoblast a plod, nesoucí antigenní znaky cizího (otcovského) původu. Tento imunologický paradox vzbuzuje zájem badatelů od počátku rozvoje moderní imunologie. Hlavní „výjimku“ z imunologických pravidel zajišťuje řada imunoregulačních mechanismů. Jakkoli četné a důmyslné, nejsou prosty poruch, které mohou mít za následek poruchy plodnosti – sterilitu, vadnou implantaci oplozeného vajíčka, patologický průběh gravidity a potrácení.

Roli styčné oblasti mezi embryem a děložní sliznicí plní trofoblast. Zpočátku se věřilo v povrchovou izolující blanku sialomucinové povahy, zabraňující fetálním makromolekulám přestupovat do matčina krevního oběhu a matčiným výkonným imunitním buňkám a jejich produktům přestupovat do fétu. Podrobnější zkoumání však záhy ukázalo, že tato bariéra není úplná ani dokonalá. Větší význam má speciální povrchová výbava trofoblastových buněk, zajišťující jejich nízkou imunogennost a vysokou odolnost na matčinu „vypuzovací“ imunitní reakci. Na syncytiotrofoblastu nejsou exprimovány „klasické“ HLA znaky I. a II. třídy (alely A, B, C, DQ, DR), což jsou potenciální aktivátory aloimunitní vypuzovací reakce a terče cytotoxických T-lymfocytů a protilátek. Místo nich jsou vyjádřeny – zvláště na invazivním trofoblastu – málo polymorfní HLA znaky E, F a G, které nevyvolávají imunitní reakci matky a nejsou citlivé na útok matčiných cytotoxických lymfocytů, makrofágů a protilátek. Výzkumy poslední doby navíc ukazují, že HLA-G molekuly trofoblastu plní i aktivní úlohy při regulaci imunity na maternofetálním rozhraní, zejména tlumí aktivitu matčiných NK buněk.

Na cytotrofoblastu je sice vyjádřeno něco HLA znaků I. třídy, chybějí však znaky II. třídy nezbytné pro aktivaci imunitních buněk. Bohatě jsou vyjádřeny specifické diferenciací znaky, jež jsou však za fyziologických okolností slabě imunogenní a navíc zřejmě prezentovány v tolerogenní formě. V hraniční oblasti dále operují antikomplementární působky (např. CD46, CD55 a CD59), jež zbavují cytotoxické protilátky jejich aktivity.

Sám **zárodek** je pro úspěšný vývoj vybaven řadou aktivních ochranných a podpůrných humorálních mechanismů (např. EPF – faktor časného těhotenství, alfa-fetoprotein, trofoblastový hCG a další). Tyto působky omezují množení a aktivaci matčiných imunitních buněk a faktorů a stupňují odolnost buněk trofoblastu a fétu na jejich působení.

Imunodepresi v oblasti implantace blastocysty a v přilehlých oblastech **děložní sliznice** zajišťují i četné humorální mechanismy. Patří sem transformační růstový faktor (TGF) beta2 a další embryotropní cytokiny (CSF-1, GM-CSF a IL-3). Důležité jsou i zonální těhotenská bílkovina (snižující aktivitu T-lymfocytů), těhotenský pro-

tein PP 14 (tlumící odpověď lymfocytů na antigenní podněty), inhibitory embryotoxických prostaglandinů – především PGF2 – a ochranné prostaglandiny série E2. Významné imunoregulační úlohy jsou připisovány i progesteronu a estrogenům, které se v hraniční oblasti mezi matkou a plodem hromadí a dosahují vysokých koncentrací. Nověji se ukazuje, že významným faktorem fyziologického těhotenství je i přesun v četnosti subpopulací Th-lymfocytů směrem k tlumivým Th2. Podílí se na tom progesteron, prostaglandin E2 a interleukiny 4 a 10.

Buňky trofoblastu mohou být poškozeny pouze LAK buňkami (zabíječi aktivovanými lymfokiny) a trofoblastotoxickými cytokiny, ty však jsou de norma blokovány výše zmíněnými ochrannými cytokiny. Říká se, že při fyziologickém těhotenství je „koncert cytokinů“ dokonale vyladěn.

2. Opakované potrácení

Skutečnost, že tolerance ze strany mateřské imunity hraje důležitou roli při uchycení i přežívání semialogenního zárodka v děloze placentálních savců, byla objasněna odhalením klonálně-selekčního principu funkce imunity (Medawar, 1953). Mnoho poznatků o narušení tolerance „otcovských“ antigenů na embryu a fétu bylo získáno na experimentálních modelech „potrácejících inbredních myší“ (Kinsky a Chaouat, 1995). V posledním desetiletí se pak problematice věnují i klinicko-výzkumná pracoviště. Dnes se obecně přijímá, že nesprávně regulovaná imunita na fetomaternálním rozhraní má valný podíl na některých typech sterilit, opakovaných časných potratů i na selhání embryotransferu.

Přibližně 70–80 % oplodnění končí z hlediska vzniku životaschopného plodu neúspěšně. Potratem pak končí 15–38 % počatých těhotenství (většina z nich ovšem není zaregistrována). Opakované „habituální“ potrácení je charakterizováno následnou ztrátou tří a více plodů v prvním trimestru; k takové situaci dochází u asi 3 procent všech žen. Většinou jde o kombinaci více příčin (anatomické, hormonální, genetické a infekční), přičemž imunopatologické mechanismy se výraznou měrou podílejí na 40–60 % případů a je třeba na ně myslet zejména u žen trpících systémovými poruchami imunitních funkcí (imunodeficiency, alergie, autoimunitní stavy).

2.1 Genetické příčiny opakovaného potrácení

V poslední se zdokonalily možnosti jejich diagnostiky, prevence a léčby (Shahine a Caughey, 2005).

Jde zejména o:

- **morfologické poruchy chromozomů** u rodičů, zjistitelné cytogenetickým vyšetřením karyotypu obou partnerů (*aneuploidie, polyploidie, delece, zlomy, translokace*);
- **funkční poruchy genů**, zjistitelné nepřímými funkčními testy (*polymorfismus genů faktoru V Leyden, protrombinu, fibrinogenu s následnou trombofilií*), průkazem chybění genů pro LIF, IL-11R alfa, Ca vázící D9K nebo narušení genů pro nespecifický supresor beta či splicing faktor SC35, klíčové jsou geny pro HLA DR3 a HLA-G.

U opakovaně potrácejících párů je třeba indikovat vyšetření obou partnerů klinickým genetikem, a to i v případech, že partneri již mají zdravé dítě (chromozomální mozaiky). Cenné je také cytogenetické vyšetření embryonálního materiálu získaného při kyretáži. V některých případech může významně pomoci preimplantační genetické vyšetření (PGD) *in vitro* získaných embryí (některé trisomie, pohlavně vázané vrozené vady).

Je-li příčinou poruch fertility chromozomální vada u některého z rodičů, je někdy nutno použít darované gamety. Některé dědičné funkční poruchy lze řešit preimplantační aplikací vhodných léků (kyselina listová a nízkomolekulární heparin při trombofilních mutacích).

2.2 Anatomické příčiny

Diagnostika a léčba anatomických poruch je v moderní gynekologii velmi dobře rozpracována. U vysokého procenta opakovaně potrácejících žen můžeme najít některou z anatomických odchylek dělohy, které jsou většinou získané. Jednou z nejčastějších příčin je těžce poškozené endometrium po předchozím zánětu nebo rozsáhlém a komplikovaném nitroděložním výkonu.

Z vrozených anatomických poruch jsou nejčastější vadné splynutí Müllerových vývodů (uterus duplex, septus, subseptus), jednostranná ageneze Müllerova vývodu (uterus unicornis), ageneze dělohy, přechodné tvary děložní (uterus tricuspidalis, T- děloha) a děložní hypoplazie.

K získaným anatomickým poruchám patří stavy po resekčních výkonech v dutině děložní, např. intrauterinní synechie, intrauterinní adheziolýza a resekce děložního septa, Ashermanův syndrom a děložní myomatóza.

2.3 Hormonové faktory

Nejčastější je hyperandrogenismus a porucha poměru FSH a LH charakteristická pro polycystózu ovárií, syndrom je v 57 % provázen hypersekreací LH. Za **nejjasněji prokázanou triádu znaků spojených s potracením** se pokládá nepravidelná menstruace, vysoké hodnoty LH a polycystóza ovárií. Léčebně se zde prověřuje „odblokování“ hypofýzy analogy LHRH. U 23 % až 60 % potrácejících bývá prokázán defekt „luteální fáze“, jehož patogenetický význam však je zpochybňován (nejméně v 6 studiích bylo podávání progesteronu bez léčebného efektu). Důležitější je asi nedostatek estrogenů v luteální fázi.

Těhotenství může být ohroženo při mnoha **endokrinních onemocněních**. Lze uvést hypotyreózu s autoprotilátkami (operuje až u 15 % případů nevysvětlitelného potracení) i hypertyreózu (časté dlouhodobé zvracení, výskyt řady komplikací), myasthenii gravis, hyperprolaktinémii, diabetes mellitus (makrosomie, anomálie). Důležitá je endometrióza s toxickým vlivem na embryo (vyvolává dysregulaci jeho genů), narušující implantaci a porušující matčinu toleranci.

2.4 Těhotenství ohrožují i infekce a záněty, především vaginální a cervikální, ale také děložní (kontrasepční tělísko), periovariální a tubální (mimoděložní těhotenství) a pelvické (apendicitida, adheze). Ztrátu plodu naznačují předchozí subfebrilita signalizující skrytý infekční proces.

Podíl *jednotlivých infekčních příčin* není přesněji určen, zvyšuje se v souvislosti s nově objevenými vyvolavateli genitálních infekcí.

2.5 Po možné účasti imunopatologických mechanismů je třeba pátrat ve všech případech primárně či sekundárně potrácejících žen, u nichž byly vyloučeny genetické, anatomické, hormonální a infekční příčiny. Takových případů je podle různých autorů 40–60 %.

2.5.1 Autoimunitní mechanismy

Nápadně vysoký výskyt opakovaného potracení je pozorován u pacientek se **systémovým lupusem erythematosum** a příbuznými autoimunitními chorobami (dermatomyozitida, Sjögrenův syndrom, vaskulitidy, chronická aktivní hepatitida, mnohotná skleróza, idiopatická trombocytopenická purpura).

Klíčovým patogenetickým faktorem je zde **druhotný antifosfolipidový syndrom**, v písemnictví je však jako samostatná jednotka uznáván i **primární autoimunitní antifosfolipidový syndrom**. Nejčastěji se uplatňují anti-kardiolipinové protilátky vážící se na beta2-glykoprotein 1 membrán cévních endotelií, významné mohou být i další antifosfolipidové, antikoagulační a antinukleární protilátky. Tyto autoprotilátky se mohou vzácně vyskytovat i u klinicky zdravých žen; jindy se opakované potracení může projevit i řadu let před manifestním rozvojem klinického syndromu.

Dříve se předpokládalo, že uvedené protilátky poškozují trofoblast nebo vytvářejí s jeho antigeny toxické imunitní komplexy. Nověji převládá názor, že poškozovány jsou primárně cévy deciduy a/nebo placenty, kde jsou nacházeny trombózy a rozsáhlé infarkty. Jejich vznik podmiňuje snížení poměru mezi vazodilatačním prostacyklinem a vazokonstrikčním tromboaglutinačním tromboxanem. Soudí se, že příbuzné mechanismy operují i při poruchách funkce placentárních cév vedoucích k vzniku eklamsií a mohou být spoluzodpovědné i za některé případy hypotrofie plodu. Recentní je zjištění, že na škodlivém působení antifosfolipidových protilátek se významnou měrou podílejí zánětlivé mechanismy (Girardi et al., 2007).

2.5.2 Aloimunitní mechanismy

Častější, ale hůře definováno je „**aloimunitní**“ **potracení**, u něhož se předpokládá narušení procesů kontrolujících matčinu přirozenou „vypuzovací“ aloimunitní reakci proti trofoblastovým a plodovým antigenům zděděným po otci.

U části potrácejících žen byly v séru prokázány humorální faktory usmrcující trofoblastové buňky nebo inhibující jejich proliferaci. Blokuující faktory (protilátky), držící tyto toxické humorální faktory „na uzdě“, u potrácejících žen často chybějí, zejména v případech značné shody matky a otce ve znacích HLA systému (u nichž se nerozvinou potřebné aktivní regulační mechanismy). Pokusy na zvířatech tomu nasvědčují: ukázaly, že aloimunizace i nespecifická imunostimulace může chorobný proces zlepšit.

Uvažuje se i o možné účasti zkrřížené **protispermiové buněčné imunity**. V našich studiích jsme prokázali její zvý-

šení u více než poloviny „idiopaticky“ potrácejících žen.

V poslední době se zodpovědnost za opakované potrácení přesouvá na mechanismy patologické **protitrofoblastové a protiplodové buněčné imunity**.

Biopsie děložní sliznice k potratům náchylných myších kmenů i opakovaně potrácejících žen prokázaly zmnožení počtu leukocytů, zvláště makrofágů a NK (resp. LAK) buněk a jejich výraznou aktivaci. Významně zvýšen bývá poměr mezi pomocnými a tlumivými T-lymfocyty – druhých je někdy tak málo, že obvyklou imunopresivní aktivitu deciduální tkáně se nedaří vůbec prokázat. Vyšší je také frekvence cytotoxických T-lymfocytů reagujících proti otcovským antigenům a produkce embryotoxických cytokinů, především IFN γ , TNF, IL-1 a IL-6. U těchto stavů se zkoumá možný podíl nedostatečné exprese nebo porušené funkce HLA-G molekul.

Velmi nežádoucí účinky na blastocystu, trofoblast a plod projevují některé trofoblastotoxické a embryotoxické cytokiny produkované aktivovanými imunitními buňkami, především INF γ , TNF α a IL-1. Tyto faktory mohou vznikat – jak ukázaly experimentální studie a potvrdily klinické analýzy – v procesu reakce matčiných leukocytů se spermii, trofoblastem i plodovými složkami.

Mechanismy buněčné imunity uspokojivě vysvětlují i vysokou potratovost žen trpících (často latentními) nitroděložními infekcemi. Spouštěcím mechanismem zde může být jednak embryotoxický IL-1, tvořený v makrofágách aktivovaných i stopovým množstvím endotoxinu (LPS), jednak INF γ , jenž vedle přímého embryotoxického působení zvyšuje na trofoblastových buňkách expresi HLA znaků: na takto „zvýrazněné“ elementy se snadno vážou cytotoxické protilátky (zánět poskytuje i složky komplementu) a zabíjecké lymfocyty.

Naše výsledky (Madar, Chaloupková, Nouza, Kinský) prokázaly v souboru 82 opakovaně potrácejících žen výrazně vyšší procento žen s pozitivní buněčnou imunitou proti trofoblastu (AT-CMI) ve srovnání s kontrolní skupinou žen s normální graviditou v anamnéze (39 % oproti 11 %). Podobné zvýšení AT-CMI jsme pozorovali u žen prodávajících recentně mimoděložní těhotenství – 64 % proti 11 % u kontrol (Kučera et al., 2005).

2.5.3 Léčebné možnosti u opakovaného potrácení z imunologických příčin.

Při „**aloimunitním**“ opakovaném potrácení vyvolaném antifosfolipidovými a dalšími prokoagulačními protilátkami je metodou léčebné volby podávání nízkých dávek kyseliny acetylosalicylové se středně vysokými dávkami glukokortikoidů, případně s nízkomolekulárním heparinem.

Je-li koncepce načasována do remise základního autoimunitního onemocnění a gravidita je kontrolována od počátku, jsou výsledky velmi dobré. V IBL ÚPMD jsme to potvrdili v rámci studií uskutečněných ve spolupráci s pražským Revmatologickým ústavem (Dostál et al., 1993). Patologické protilátky lze také dočasně odstranit opakovanou plazmaferézou samotnou či kombinovanou se specifickou sorbcí. Příznivou odezvu může vyvolat i imunomodulačně působící (ale velice drahá) opakovaná i.v. aplikace vysokých dávek imunoglobulinů. Léčbu je třeba zahájit do

dvou dnů po ovulaci: zahájení až při průkazu otěhotnění je méně účinné.

Při „**aloimunitním**“ potrácení (s předpokládanou účastí patologické buněčné imunity) se nabízí léčba i monoklonálními protilátkami proti T-lymfocytům, cyklosporinem A či pentoxyfilinem. Blokádu embryotoxických cytokinů a prostaglandinů lze uskutečnit monoklonálními protilátkami a selektivními inhibitory a snad i aplikací embryu podporujících cytokinů (CSF-1, GM-CSF, IL-3), prostaglandinů a dalších působků. Recentní zprávy svědčí pro výraznou léčebnou aktivitu perorálně podávaných kombinací proteolytických enzymů, komplexní léčba zahrnuje i nízké dávky glukokortikoidů (Prednisonu). Významnou podmínkou úspěchu imunomodulační léčby je minimalizace antigenního dráždění sliznic ženského pohlavního ústrojí v době před oplozením a v prvním trimestru gravidity (důsledná léčba genitálních infekcí, kondomová okluze alespoň v době mimo ovulaci).

Tam, kde byl u partnerů prokázán vysoký stupeň shody ve znacích HLA systému a/nebo nedostatek blokujících faktorů, se doporučuje imunizovat ženu partnerovými leukocyty (či mononukleáry) nebo jeho kožními štěpy. Příznivé zkušenosti byly získány i po imunizaci materiálem od cizích („third party“) mužů, trofoblastovými membránami, seminální plazmou i spermii a dokonce i po převodech plné krve. V pilotních i kontrolovaných studiích byly ohlášeny příznivé efekty, jiné studie však účinnost aloimunizace a na možnost přenosu nebezpečných infekčních agens (HIV, HCV). Uplatňovat se může také placebový efekt, potvrzovaný příznivým působením psychoterapie.

Tab. 1: Současné preventivní a léčebné postupy při opakovaném, potrácení

Progesteron a deriváty: 17-HP (Neolutin), dihydroP (Duphoston) v dávkách 250 mg týdně až do porodu

hCG: vysoké dávky až do porodu

Při IVF-ET a ICSI:

Manipulace s vajíčkem – zlepšení způsobu kultivace a přenosu blastocysty, prodlužování „hatching“, letrozol, NSAID (piroxicam), emfilermin (r-hLIF), manipulace hrdlem uteru po přenosu.

Imunologická léčba:

Imunoterapie leukocyty, i.v. imunoglobulin – většinou jsou pokládány za velmi drahé a překonané

– při **autoimunitním potrácení (APS nebo přítomnost antifosfolipidových protilátek)** se doporučuje podávat prednison (do 5 mg denně), malé dávky aspirinu (do 100 mg denně), při těžké trombofilii heparin, osvědčuje se i Wobenzym (v denních dávkách 10 dražé),

– při **aloimunitním potrácení (vysoká BI proti spermii a/nebo trofoblastu)** se osvědčuje kombinace prednisonu, dihydroprogesteronu a Wobenzymu, případně i HCG.

Tab. 2: Povaha léčebných zásahů

Progesteron vede k indukci PIBF, přesunu od Th1 k Th2 typu imunitní odpovědi, snížení Th1 buněk, aNK, LAK a CTL, zvýšení asymetrických protilátek, projevuje i stabilizační působení na interakce děloha – plod.

Aspirin a heparin regulují koagulaci, tlumí aktivaci komplementu, usnadňují adhezi blastocysty a invazi trofoblastu.

HCG projevuje luteotropní efekt a podporuje implantaci.

Wobenzym má protizánětlivé, imunonormalizační a fibrinolytické působení.

2.5.4 Prekoncepční péče (Barclay a Vega, 2007)

Snahy o **prekoncepční péči o ženy** trvají přes 10 let, dosud se však nestala součástí péče domácích lékařů ani odborníků, svá práva neznají ani samy ženy. Těhotenství by mělo být plánováno a vytvořeny vhodné podmínky pro jeho průběh. V USA je vytvářen „nový model“ rodinné medicíny s „balíčkem“ příslušných služeb a připravovány právní i zdravotnické normy a rozsáhlá literatura. Probíhá i intenzivní výzkum prekoncepčního zdravotního stavu žen, zvláště s problémy otěhotnění a předchozích těhotenství.

Tab. 3: Zásahy v rámci prekoncepční péče

u ženy	následky u dítěte
Podávání kyseliny listové	sníženy o 2/3 neurální defekty
Očkování proti zarděnkám	omezen „z. syndrom“
Úprava diabetu	omezeny 3× zvýšené vrozené defekty
Léčba hypotyreózy	zlepšen neurologický vývoj
Vyléčení pohlavních chorob	omezeny ment. retardace, slepota
Léčba fenylketonurie	omezena mentální retardace
Vysazení warfarinu	omezeny teratogenní efekty
Výběr antiepileptik	nahrazena teratogenní
Omezení isotretinoinu	omezení potratů a vrozených defektů
Vysazení kouření a alkoholu	omezení vrozených defektů
Redukce obezity	prevence neurodefektů, diabetu, hypertenze, tromboembolismu
Očkování proti VHB	ochrana plodu i ženy (ci, Ca, selhání jater)
Léčba HIV	omezení přenosu na plod

3. Implantace (nidace, „uhníždění“) oplozeného vajíčka a její poruchy

Zatím co vlastnosti a funkce spermií a vajíček jsou poznány do největších podrobností a podrobně zmapován je i proces jejich splynutí a vývoje blastocysty (celý proces dovedou odborníci na asistované oplodnění dokonale reprodukovat), je významná složka reprodukčního cyklu – uhníždění (nidace, implantace) oplozeného vajíčka v děloze a jeho zdárný vývoj poznáván až v poslední době. Postupně se objevuje mimořádně komplexní proces složitých interakcí mezi endometriem, trofoblastem a plodem, citlivý na řadu vnitřních poruch a zevních škodlivých vlivů.

Mechanismy nidace zygoty a jejich poruchy jsou v posledních letech intenzivně studovány zejména při objasňování **nevysvětlitelných sterilít** u „zdravých“ párů, kde podrobné vyšetření vyloučí účast genetických, anatomických, hormonálních a infekčních faktorů a u **neúspěšných transferů** „perfektního“ embrya do dobře připravené děložní sliznice. Poruchy nidace mohou mít navíc za následek i **opakované časné ztráty plodu** a někdy stojí na počátku pozdních těhotenských komplikací – nitroděložní růstové retardace (IUGR), předčasného porodu nebo preeklampsie.

Nidace je velice komplexní mnohastupňový proces (viz tab. 1, 2) a na kterémkoli jeho stupni se mohou projevit

poruchy. Jen část z nich však zatím dovedeme přesně určit a ještě menší část cíleně ovlivnit.

Tab. 4: Hlavní fáze implantace

Adheze embrya: uplatňují se adhezni molekuly E-cadherin, P-cadherin, konexiny, integriny.
Interakce buněk endometria a trofoblastu: významná je interakce NK a HLA-G.
Překonání mucinové bariéry a průnik trofoblastu: uplatňují se štěpící enzymy (metaloproteinázy, kolagenázy, stromolyzin, plazmin) a adhezni molekuly (selektiny).
Proliferační a syncytializace trofoblastu: uplatňují se četné růstové faktory a cytokiny.
Decidualizace: proces je řízen „zánětlivou reakcí“ a provázen intenzivní angiogenezí.

Tab. 5: Na vlastní implantaci se podílí velké množství faktorů na straně matky i plodu

endometrium	embryo – trofoblast
„Implantační estrogenové okno“ 2dny!	IL-1 β , IL-6, IL-10
Změny v genomu (36 up, 27 down)	HLA-G – orchestrační signály
Dočasná bariéra (okludin, klaudin) musí být prolomena	(útlum matčiných NK, CD8 a CD4 T bb)
Hormony CRH+R, GK-R, E, P, HCG, PL	Syncytializace
Calbindiny (vazba Ca)	(účast PL – PE, PS, PCh, CL)
Integriny a adhezni kinázy	
Epidermální faktor	Cadheriny a d. (adheze)
Heparin vázající faktor	NO, MMPS, gelatinázy, proteázy
LIF, IL-1 β (indukce prostaglandinů)	fosfolipázy (průnik do endometria)
Inzulínu podobný faktor	Inhibin A (podpora placenty)
Zinek – hlavní z nezbytných prvků	VEGH, FGF (angiogeneza v placentě)
Podpůrné cytokiny	α -fetoprotein, laktogen

Při **určování příčin poruch implantace** při neplodnosti, selhávání IVE, opakovaných časných potratech je třeba pátrat po genetických, anatomických, hormonálních, infekčních (zánětlivých), toxických a imunologických faktorech. Ambiciózním cílem je porozumět mylným „slovům“ probíhající diskuse mezi zárodkem, trofoblastem a endometriem, chybným kontaktům somatických i imunitních buněk (povrchové znaky, adhezni molekuly), narušení „koncertu“ cytokinů a následně dokázat tyto omyly napravit.

3.1 Genetické příčiny poruch implantace jsou obdobné s faktory uvedenými u opakovaného potracení.

3.2 Anatomické příčiny poruch implantace jsou rovněž obdobné s příčinami uvedenými u opakovaného potracení. Často podmiňují ženinu sterilitu. Pokud vůbec dojde na defektním endometriu k nidaci, může vést následný vývoj plodového vejce k patologickým interakcím mezi placentou a děložní stěnou (placenta accreta, increta a percreta). Můžeme sem zařadit i adenomyózu,

vyvolanou hyperperistaltikou s proliferací bazálního endometria do myometria.

3.3 Hormonální příčiny poruch implantace jsou nejčastější, nejdéle známé a úspěšně léčitelné. Za významný je pokládán nedostatek estrogenů (nevzniká „estrogenové okno“), HCG, CRH a inzulinu podobného růstového faktoru. Nízká hladina progesteronu způsobuje nedostatek důležitého imunoregulačního PIBF (progesteron-induced blocking factor, Szekeres-Bartho, 2002). Nadbytek prolaktinu a jeho receptoru, stejně jako nadbytek androgenů působí negativně nejen na ovulaci, ale i na implantaci zárodku.

Diagnostika a léčba hormonálních poruch pokročila zejména v souvislosti s rozvojem technik asistované reprodukce. K podpoře implantace embrya je v současnosti rutinně používána substitute analogy progesteronu (17-hydroxyprogesteron – Neolutin, dihydroprogesteron – Duphaston).

3.4 Infekční příčiny poruch implantace jsou široce vyhledávány, diagnostikovány a rutinně léčeny. Implantace embrya může být narušena **přímo** (akutní záněty endometria, febrilní stav při nespecifických infekcích, bakteriální toxiny), **morfologickými důsledky** (synchie, pozánětlivé změny endometria) i **imunologickými důsledky** (aktivace deciduálních makrofágů, T a NK buněk, zmnožení prozánětlivých a embryotoxických cytokinů).

Mezi nebezpečné mikroorganismy patří: mykoplazmata, ureaplazmata, toxoplazmata, trichomonády, chlamydie, bakterie (listerie), některé viry (CMV, EBV, viry rubeoly, chřipky, spalniček, herpetické viry, parvoviry B19) i běžné mykózy se však mohou podílet na patologické aktivaci lokální imunity v pohlavním systému.

Diagnostika a léčba: Při infekčních příčinách implantace embrya je velmi důležité v největší možné míře vyléčit genitální záněty obou partnerů. Je třeba odhalit a lege artis vyléčit i klinicky málo výrazné infekce (*Gardnerella vaginalis*, kandidóza), které mohou stimulovat lokální slizniční imunitu ženina pohlavního systému.

3.5 Imunologické faktory

Protilátky jako patogenetický mechanismus poruch implantace jsou podezřívány delší dobu. Protilátky **proti spermiím** by mohly působit zkříženou reakcí proti „otcovským“ antigenům na blastocystě i trofoblastu, časné fáze implantace embrya mohou porušit i autoprotilátky **proti zona pellucida oocyty a proti adnexinům**, protilátky **proti antigenům invazivního trofoblastu a autoprotilátky proti cévám mateřské části placenty**, zejména proti fosfolipidům membrán endotelií (např. vyvoláním embolizaci nově vznikajících spirálních arterií s následnými poruchami placentace).

Cytokiny

V koncertu cytokinů je v periimplantačním období vyjádřena dominance **podpůrných a imunosupresivních cytokinů** IL-1 (proimplantační), IL-11, IL-10, TGF beta, GM-CSF, glykodelin, leptin, LIF, EGF, HGF, produkova-

ných hlavně Th2 buňkami a „tlumivými“ T3reg buňkami, podle současných poznatků je klíčový správný poměr mezi interleukiny IL-12 a IL-18.

Za významný je pokládán PAF-1 (1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-fosfocholin), první významný autokrinní embryotrofin, který působí příznivě i na dělohu.

Při **poruchách implantace** se uplatňují **embryotoxické cytokiny** tumor necrosis factor (TNF), interferon (IFN) gama a IL-6.

Buňkami zprostředkovaná imunita představuje hlavní soubor mechanismů zajišťujících mírový vztah mezi mateřskou imunitou a implantujícím se embryem. Zastoupení buněk imunitní soustavy se v periimplantační zóně a v těhotenském endometriu výrazně zvyšuje (až na 35 %).

Přirození zabíječi (natural killers, NK buňky, CD 56+, 16-) představují hlavní imunologicky aktivní buňky sliznice dělohy (70 až 80 %). Před implantací jsou většinou v metabolickém klidu, v místě implantace se hromadí a aktivují. Za jejich hlavní úkoly se pokládají rozpoznávání trofoblastu (HLA-G) a tvorba angiogenních faktorů (potřebných ke tvorbě spirálních arterií). V těhotenství se cytotoxicita NK v placentě výrazně snižuje, škodlivé efekty na trofoblast a plod nebyly prokázány. Za nebezpečné se pokládají pouze aktivované NK buňky. Vede se diskuse, zda mezi místními a krevními NK buňkami existuje jasná korelace.

Při **poruchách nidace** a opakovaném potrácení jsou sníženy NK s KIR (inhibičními receptory) a zvýšeny aktivované NK (CD69, CD101, CD94).

T-lymfocyty deciduy představují cca 10 % všech imunologicky aktivních buněk. Při implantaci se CD4 a CD8 buňky snižují, zatím co tlumivé T-buňky se zvyšují. Při **poruchách nidace** a opakovaném potrácení jsou zmnoženy aktivované T-buňky (CD 26+ a 69+, HLA-DR+), navíc se snižuje jejich apoptóza, v krvi jsou zvýšeny Th1-buňky, tvořící IFN gama a TNF alfa.

Makrofágy (cca 15–20 % všech imunokompetentních buněk v endometriu) zajišťují protiinfekční obranu. Přítomnost aktivovaných makrofágů je prokazována při opakovaném potrácení a mohou pravděpodobně narušovat i implantaci embrya.

Totéž platí o **žirných buňkách** tvořících abortigenní tryptázu a IL-8.

3.6 Toxické faktory

Negativní vliv toxických látek na plodnost obecně a implantaci embrya zvláště je široce diskutován. Samozřejmým požadavkem je omezit ty toxické faktory, jejichž incidenci může pacient či lékař ovlivnit. Jde zejména o **léčiva** – u všech léčivých přípravků je uvedena jejich použitelnost v době gravidity. Je vhodné upozornit pacientku na nutnost sledovat tento údaj i u volně prodejných léků a vyloučit nevhodné léky již v období snahy o koncepci.

Návykové látky jsou obecně vnímány jako škodlivé pro fertilitu, jejich vliv na implantaci embrya je však cíleně sledován až v poslední době. U **abusu alkoholu** je známo negativní působení na vývoj gamet a embrya, byl proká-

zán i inhibiční vliv na syntézu progesteronu (Hill et al., 2005). **Nikotinismus** rovněž působí negativně na implantaci embrya, je uváděno několik efektorových mechanismů (Mlynarcikova et al., 2005). Podle údajů American Society for Reproductive Medicine z r. 2003 je kouření 15 cigaret denně příčinou nejméně dvojnásobného snížení úspěšnosti embryotransferu při IVF (viz Smoking and Infertility na www.asrm.org). Pro úspěšnou implantaci embrya je proto žádoucí, aby žena omezila konzumaci alkoholu a přerušila kouření již prekoncepčně.

3.7 Testy sloužící k určení poruchy implantace (tab. 6)

Tab. 6: K určení příčin poruch implantace se zavádí řada testů (tab. 3) Pr

U ženy
Genetické vyšetření a prevence trombofilie (např. mutace v ACE nebo PAF-1).
Přesné určení a úprava anatomických poruch.
Určení a úprava hormonových poruch:
hyperprolaktinémie, hyperhomocysteinémie
hypo- HCG, hypo- ACE, hypofolatémie, endometrióza
Diagnostika a vyléčení genitálních infekcí.
Hodnocení kvality embrya
Jsou vypracována morfologická kritéria a metody genetického vyšetření jedné buňky odebrané z blastocytu, jako nadějně se jeví i určení hodnoty rozpustného HLA-G v kultivačním mediu embryí.

3.8 Prevence a léčba poruch nidace je v začátcích

Používá se kyselina listová, vitaminy (B6), hormony progesteron a jeho deriváty (17-hydroxyP, dydrogesteron- Duphaston), a HCG. Zatím nezastupitelné jsou glukokortikoidy, v indikovaných situacích aspirin a heparin (většinou jeho nízkomolekulární forma), imunomodulační Wobenzym, význam má i systematická psychoterapie. Odstraňují se anatomické, infekční (zánětlivé) a imunologické příčiny – zvláště patologické protilátky a vystupňovaná buněčná imunita. Do budoucna se plánují genetické manipulace se spermii, vajíčky a blastocystami.

MUDr. Karel Nouza, DrSc.
Centrum klinické imunologie
Havelská 14,
110 00 Praha 1
e-mail: karel-nouza@volny.cz

LITERATURA

- Barclay L, Vega Ch. CDC Issues Guidelines fo Preconception care of Women 2007. http://www.medscape.com/viewarticle/553457_print
- Bernstein PS. 17-alpha Hydroxyprogesterone Resurrected for the prevention of recurrent preterm delivery 23th Annual Meeting, Soc. Maternal-Fetal Medicine, San Francisco, California 2003; 12, 2, 3-8.
- Clark DA. Is there any evidence for immunologically mediated or immunologically modifiable early pregnancy failure? J Assist Reprod Genet 2003; (2), 63-72.
- Coulam CB. Immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. Early pregnancy 1995; 1: 13-26.
- Coulam CB, Roussev RG. Increasing circulating T-cell activation markers are linked to subsequent implantation failure after transfer of in vitro fertilized embryos. Am. J. Reprod. Immunol. 2003; 50,(4), 340 – 45.
- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. Science 1994; 266, 1508-18.
- Dimitrov DG, Sedlak R, Nouza K, Kinsky R. A quantitative objective method for the evaluation of anti-sperm cell-mediated immunity in humans. J Immunol Methods 1992; 154, 147-153.
- Dimitrov DG, Sedlák R, Nouza K, Kinský R.: Buňkami zprostředkovaná imunitní reaktivita proti spermii při poruchách lidské reprodukce, Čes Gynekol 1992; 57 (9-10), 472-479.
- Dittmar FM. Systémová enzymoterapie – způsob imunoterapie imunologicky podmíněných habituálních potratů (překlad). Fórum imunologie 2000; II-VIII, 3-4.
- Dostál C, Madár J, Nouza K, Palečková A, Vencovský J, Tezgová D, Figurová E, Kovařík J, Andělová K, Vízek K, Vlasáková V, Vítová J. Praktické výsledky sledování těhotenství u žen se systémovým lupus erytematodes. Čas Lék Čes 1996; 135, 789-795.
- Garzia E, Borgato S, Cozzi V, Doi P, Bulfamante G, Persani L, Cetin I. Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. Hum. Reprod. 2004; 19,(8), 1911-1916.
- George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath E, Cnattingius S. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. JAMA. 2002; Oct 16, 288 (15):1867-1873.
- Gianaroli L, Magli MC, Fiorentino F, Baldi M, Ferraretti AP. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. Placenta 2003; Suppl. B: S 377-83.
- Girardi G, Kockshin MD, Salmon JE. The antiphospholipid syndrome as a disorder initiated by inflammation: Implications for the therapy of pregnant patients. Nat Clin Pract Rheumatol 2007; 3 (3), 140 – 147.
- Herrler A, von Rango U, Beier H-M. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. Reprod Biomed Online 2003; 6 (2), 244-256.
- Hill M, Popov P, Havlikova H, Kancheva L, Vrbikova J, Meloun M, Kancheva R, Cibula D, Pouzar V, Cerny I, Starka L.: Reinstatement of serum pregnanolone isomers and progesterone during alcohol detoxification therapy in premenopausal women. Alcohol Clin Exp Res. 2005; Jun 29(6),1010-1017.
- Hviid TVE. HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth. Hum. Immunol. 2004; 65, 586-593.
- Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. Int Arch Allergy Immunol. 2004; Jun134(2):93-119
- Christiansen OB. Epidemiological, immunogenetic and immunotherapeutic aspects of unexplained recurrent miscarriage. Dan Med Bull 1997; 44, 396-424.
- Iborra A, Palacio JR, Ulcova-Galova Z, Martinez P. Autoimmune response in women with endometriosis. Am J Reprod Immunol. 2000; 44(4):236-241.
- Kämmerer U, von Wolf, M, Markert UR. Immunology of human endometrium. Immunobiology 2004; 209, 7, 569-574.
- Kinsky R, Chaouat G. Immunological factors predicting early pregnancy. In: Immunology of Human Reproduction (eds.: Kurpisz, Fernandez), Bios Scientific Publishers, Oxford, 1995; 217-233.
- Kirchner JT. Use of prednisolon and aspirin for recurrent fetal

- loss. *Am Family Physician*, 1998; March 1, 1-2. (http://findarticles.com/p/articles/mi_m32225/is_n5_v57/ai_20460473).
24. Koepfel B. Psychological management of women with implantation failure. *J Gynekol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2004; 33, S43-45.
 25. Krussel JS, Bielfield P, Rolan ML, Simon C. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol Suppl* 2003; 110, S2-9.
 26. Kučera E, Křepelka P, Krofta L, Feyereisl J, Hejda V. Těhotenské komplikace po intrauterinní hysteroskopické chirurgii. *Čes Gynek* 2005; 70, 312-316.
 27. Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Coulomb-L'hermine A, Durand-Gasselini I, Frydman R, Chaouat G. A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 81(1), 59-65.
 28. Leyendecker G, Kunz G. Endometriosis and adenomyosis. *Zentralbl Gynäkol* 2005; 127, 288-294.
 29. Madár J, Nouza K, Nováková D. Imunologické aspekty habituálního potrácení. *Mod gynekol porodn* 2002; 11(4), 621-627.
 30. Madár J, Pěkníková J, Šula K, Tolarová M, Nováková D, Kinsky R. Anti-trophoblast and anti-cardiolipin immunity in repeated miscarriages – diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 2003; 58(2), 179.
 31. Madár J, Urbánek V, Chaloupková A., Nouza K., Kinsky R. Úloha autoprotilátek a buněčné autoimunity proti spermii v patogeneze mužské neplodnosti. *Česká gynekologie* 2002; 67 (1), 3-7.
 32. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953; 7, 320-328.
 33. Mlynářčiková A, Fickova M, Scsukova S. Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocr Regul.* 2005; 39(1), 21-32.
 34. Moffett A, Regan L, Braude P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *Brit Med J* 2004; 329, 1283-1285.
 35. Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *J Reprod Med* 2003; 48 (3), 137-47.
 36. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi OR. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005; 20 (1), 138-146.
 37. Nouza K. Imunologie a imunopatologie reprodukčního procesu. *Mod gynek porod* 1991; 1, (3), 1230-1264.
 38. Nouza K, Kinsky R, Dimitrov D. Immunology and immunopathology of reproduction. *Folia biol* 1992; 38, 170 –194.
 39. Nouza K, Kinsky R, Petrovska M, Dimitrov D, Sedlak R, Presl J, Laitl J. Immunocytes and cell-mediated immunity in the pathology of reproduction. *Adv Exp Med Biol* 1995; 371A, 373-377.
 40. Nouza K, Madár J, Kinsky R, Dostal C, Palečková A. Autoimunitní habituální potrácení. *Čes Gynek* 1996; 61, 310-316.
 41. Nouza K, Nouza M, Madár J. Prevence a léčba imunologicky podmíněného opakovaného potrácení. *MEDICÍNA* 2000; 6/VII, 21.
 42. Nouza K, Nouza M. Zánět optimalizující a imunonormalizační účinky kombinací proteolytických enzymů. *Alergie* 2002; 4, 326-329.
 43. Nouza K., Madár J., Kučera E., Nouza M., Tolarová M., Nováková D. Mechanismy ovlivňující implantaci embrya – novinky posledních let. *Čes Gynekol* 2006; 71(6):489-494.
 44. O'Neill Ch. The role of PAF in embryo physiology. *Human Reprod Update* 2005; 11 (3), 245-228.
 45. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls. *J Soc Gynecol Investig* 2003; Sep10(6):315-322. Review.
 46. Rai R, Tuddenham E, Backos M, Jivraj S, El'Gaddal S, Choy S, Cork B, Regan L. Thromboelastography, whole-blood haemostasis and recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2003;18(12), 2540-2543.
 47. Raine-Fenning NJ, Campbell BK, Kendall NR, Clewes JS, Johnson IR. Endometrial and subendometrial perfusion are impaired in women with unexplained subfertility. *Hum Reprod* 2004; 19 (11), 2605-2614.
 48. Regan L, Backos M, Rai R. Immunological testing and interventions for reproductive failure. *Royal College Obstet Gynaecol* 2003; 11, 1-8.
 49. Saito S. Cytokine network at the foeto-maternal interface *J Reprod Immunol* 2000; 47 (2), 87-103.
 50. Shahine LK, Caughy AB. Preimplantation genetic diagnosis: the earliest form of prenatal diagnosis. *Gynecol Obstet Invest* 2005; 60(1), 39-46.
 51. Sharkey AM, Smith SL. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Practice & Research Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17, 289-307.
 52. Stern C, Chamley L, Norris H, Hale L, Baker HW. A randomized, double-blind, placebo controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and anti-phospholipid or antinuclear antibodies. *Fertil Steril* 2003; 80 (2) 376-283.
 53. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002; 21, 471-95.
 54. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue antigens* 2004; 63 (1), 1-12.
 55. Ulčová-Gallová Z. Normální a patologická imunologie těhotenství. *Moder Gynekol Porodn* 2001; 10,1, 68-73.
 56. Ulčová-Gallová Z, Bouše V, Svabek L., Turek J, Rokyta Z. Endometriosis in reproductive immunology. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47, 269-274.
 57. Ulcova-Galova Z, Krauz V, Novakova P, Milichovska L, Micanova Z, Bibkova K, Sucha R, Turek J, Balvin M, Rokyta Z. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 54 (2), 112-17.
 58. Yamada H, Shimada S, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoe K, Minakami H. Divergence of natural killer cell receptor and related molecule in the decidua from sporadic miscarriage with normal chromosome karyotype. *Mol Hum Reprod* 2005; 11, (6) 451-57.

LITERATURA K I. DÍLU ČLÁNKU ALERGIE 2/2007 strana 135-141.

Vlastní výsledky autorů citované v tomto článku byly zčásti získány v rámci řešení grantových projektů podporovaných Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (NR6463-3, NR7838-3).